

München, 1960

Der Opsonocytophagentest bei schutzgeimpften
und künstlich mit Brucellen infizierten
Versuchstieren

Joseph Pogátsa Murray

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. A. Meyn

DER OPSONOCYTOPHAGENTEST BEI SCHUTZGEIMPFTEN
UND KÜNSTLICH MIT BRUCELEN INFIZIERTEN
VERSUCHSTIEREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Joseph Pogátsa Murray
aus
Fertőendré (Ungarn)

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. K. Zipf

Referent : Prof. Dr. A. Meyn

Tag der mündlichen Prüfung : 26. 2. 1960

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Geschichtliches	2
C. Eigene Untersuchungen	10
1. Material und Methodik	10
a. Vorbereitungen zur Blutentnahme	10
b. Bakteriensuspensionen	10
c. Antikoagulans	11
d. Die Blutentnahme	11
e. Der eigentliche Test	12
f. Tiermaterial	15
2. Untersuchungsergebnisse	16
a. Meerschweinchenversuche	16
b. Besprechung der Meerschweinchenversuche	25
c. Rinderversuche	28
d. Besprechung der Rinderversuche	33
D. Zusammenfassung	37
E. Literaturverzeichnis	38



A. EINLEITUNG

Die erfolgreiche Bekämpfung der Rindertuberkulose in Deutschland hat heute die Brucellose der Rinder zu einem Hauptproblem der Tierseuchenbekämpfung werden lassen. Da es auch gegen diese Krankheit noch keine sicheren Heilmittel gibt, versucht man, die Seuche durch Ausschalten der Infektionsquellen zu tilgen. Jedes erfolgreiche Tilgungsverfahren setzt aber eine sichere Erkennung der betreffenden Krankheit voraus. Zu diesem Zweck benötigt man eine diagnostische Methode, mit deren Hilfe man die infizierten Tiere von den gesunden trennen kann.

Unsere heutige, für die Diagnose der Brucellose am besten geeigneten Methoden, die Blutserum-Langsam-Agglutination und die Abortus-Bang-Ringprobe, erfüllen diese Forderungen zwar in hohem Maße, sie versagen in manchen Fällen aber doch. Es kommt vor, daß mit diesen Methoden infizierte Tiere nicht erfaßt werden, und außerdem gestatten sie keine Unterscheidung von schutzgeimpften und infizierten Tieren. Diese Tatsachen machen es notwendig, nach besseren bzw. ergänzenden diagnostischen Methoden für die Erkennung brucelloseinfizierter Rinder zu suchen. Umfangreiche Untersuchungen zum Brucelloseproblem, die u. a. auch dieses Ziel im Auge haben, werden zur Zeit im Tierhygienischen Institut der Universität München geführt.

Im Rahmen dieser Versuche wurde mir von Herrn Prof. Dr. A. Meyn die Aufgabe gestellt, die Gebrauchsmöglichkeiten des Opsonocytophagentestes nach Huddleson für diagnostische Zwecke und immunologische Forschungen bei künstlich infizierten Rindern und Meerschweinchen zu prüfen.

B. GESCHICHTLICHES

Am Ende des vorigen Jahrhunderts (1883) hat Metschnikoff die Beobachtung gemacht, daß die weißen Blutkörperchen die Fähigkeit haben, kleinste korpuskuläre Elemente und Mikroorganismen in sich aufzunehmen. Diese Zellen nannte er Phagocyten und das Phänomen Phagocytose. Die weißen Blutkörperchen nehmen die Bakterien durch amöboide Bewegung in sich auf und machen sie unschädlich. Diese Funktion der Blutzellen steht bei der Infektionsabwehr im Organismus an erster Stelle.

Wright (1903) hat festgestellt, daß gewaschene weiße Blutkörperchen nicht instande sind, die Mikroorganismen zu phagocytieren. Setzte er aber einen Tropfen Normalserum dem Blut-Bakteriengemisch zu, so phagocytierten die weißen Blutkörperchen die Mikroorganismen wieder. Dadurch wurde nachgewiesen, daß die weißen Blutkörperchen gewisse Stoffe, die die Bakterien für Phagocytose sozusagen "schmackhaft" machen, benötigen. Diese Stoffe hat Wright als Opsonine bezeichnet. Diese Normal-Opsonine, die im Serum vorhanden sind, sind thermolabil; sie werden schon bei 60 °C zerstört.

Neufeld (1904) hat später im Serum infizierter Tiere auch phagocytosebegünstigende Stoffe entdeckt, die in größeren Mengen vorhanden sind und bei 60 °C nicht zerstört werden. Er nannte diese thermostabilen Stoffe Bakteriotropine.

Aus diesen Tatsachen geht hervor, daß der Körper nach einer Infektion außer den eigentlichen Antikörpern auch gewisse Abwehrstoffe produziert, welche die Phagocytose ermöglichen sollen. Das Vorhandensein dieser Abwehrstoffe im Organismus setzt also eine Infektion voraus. Umgekehrt kann aber auch aus dem Nachweis solcher Abwehrstoffe in einem Organismus auf das Vorliegen einer Infektion geschlossen werden.

Diese Erkenntnis hat man schon früh für prognostische und diagnostische Zwecke in Form eines phagocytären Index auszunützen versucht. Die Methode, mit der man den phagocytären Index erhielt, nannte man Opsonocytophagengest. Mit dem Wort "Opsonin" meinte man nun freilich nicht normale, sondern spezifische Opsonine, also genau genommen Tropine.

1933 erschien in den Vereinigten Staaten von Nordamerika ein Artikel von Huddleson, Johnson und Hamann über den Opsonocytophagengest bei *Brucella* infizierten Menschen.

Zur Bestimmung der opsonocytophagischen Fähigkeit des Blutes haben die drei Forscher eine Modifikation der Leishman-Veitch-Technik angewandt. Die Methode besteht darin, gleiche Teile frischen Zitratblutes und eine dichte Aufschwemmung lebender Brucellabakterien in kleinen Wassermann-Röhrchen für 30 Minuten bei 37 ° C zu halten, dann Ausstriche herzustellen und nach Hastings zu färben. Die Zufügung einer bestimmten Menge von Na-Zitrat verhindert das Gerinnen des Blutes und hemmt die Tätigkeit der Normalopsonine, die in jedem Serum gesunder Individuen vorhanden sind. Die Endverdünnung des Na-Zitrates im Blut beträgt 0,8 %. Die Prüfung der Blutproben soll innerhalb von 6 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt und die Proben bis zur Weiterverarbeitung kühl aufbewahrt werden. Die segmentkernigen Leukocyten zerfallen nämlich sehr schnell, wenn sie für 2 oder 3 Stunden warm gehalten werden. Die Proben müssen vor dem Mischen mit der Bakteriensuspension vorsichtig geschüttelt werden.

Die Bakteriensuspension muß jeden Tag frisch zubereitet werden. Einige Ösen des Bakterienrasens einer 48 Stunden alten Kultur von Leberagar werden in physiologischer Kochsalzlösung von pH 7 suspendiert und auf einen bestimmten Trübungsgrad eingestellt. Suspensionen jeder der drei Brucella-Arten sind ohne Rücksicht auf die Virulenz der Stämme für den Test geeignet. In saubere kleine Röhrchen gibt man 0,1 ccm des Zitratblutes und 0,1 ccm der Bakteriensuspension. Nach dem Mischen werden die Röhrchen 30 Minuten im Wasserbad bei 37 ° C gehalten.

Ununterbrochene Bewegung während der Inkubation führt leicht zur Verhinderung der Phagocytose. Während der Inkubationszeit tritt eine erhebliche Sedimentierung der Blutzellen ein. Ohne die Röhrchen aufzuschütteln, wird sofort nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbad mit einer Kapillarpipette, an der ein kleiner Gummiball befestigt ist, eine kleine Menge der sedimentierten Zellen entnommen, auf einen sauberen Objektträger gebracht und ein dünner Ausstrich angefertigt. Die Blutausstriche sollen so schnell wie möglich trocknen, um eine Schrumpfung der Leukocyten zu verhindern. Das schnelle Trocknen kann durch einen kleinen Ventilator erreicht werden. Ein kleiner elektrischer Heizofen, kombiniert mit einem kleinen Ventilator, ist gut geeignet zum Trocknen der Ausstriche. Bei Routineuntersuchungen werden insgesamt 25 Zellen von verschiedenen Stellen des Ausstriches gewählt. Eine Zelle wird als negativ angesehen, wenn keine Bakterien phagocytiert sind, als schwach positiv, wenn 1-20, als mittelgradig, wenn 21-40 und als stark positiv, wenn über 40 Bakterien in den Zellen vorhanden sind,

bzw. die eingeschlossenen Keime auf Grund ihrer großen Zahl gar nicht mehr ausgezählt werden können. Bei der praktischen Anwendung ihres Testes beobachteten Huddleson, Johnson und Hamann, daß die polymorphkernigen Leukocyten erkrankter, genesener und z. T. auch gefährdeter Personen eine erhöhte Phagocytose-Aktivität aufwiesen.

Angeregt durch diese Untersuchungen haben Meyer, Stewart, Veazie und Eddie im darauffolgenden Jahr (1934) weitere Untersuchungen über den Opsonocytophagentest beim Menschen ausgeführt. Diese Forscher haben wieder mit geringen Abänderungen die "Veitch-Technique" angewandt. Ein oder zwei Tropfen einer 1,6 %igen Na-Zitratlösung werden in kleinen Röhrchen aufgefangen und das Lösungswasser vor der Blutentnahme zum Verdampfen gebracht. Weiterhin folgten sie im wesentlichen der von Huddleson und Mitarbeiter angegebenen Methode. Die Untersuchungen ergaben, daß bei Personen, die niemals Kontakt mit Brucellen hatten, der phagocytäre Index unter 1 lag. Ein hoher Index von 1 - 28,4 trat auf in klinisch akuten und geheilten Fällen bei banginfizierten Laboratoriumsangestellten, Tierärzten und Angehörigen der ländlichen Bevölkerung. Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, daß die erhöhte spezifische Phagocytose-Aktivität die Folge einer erkannten oder latenten Brucella-Infektion war. Die gleichen Erfahrungen wurden auch bei Angestellten von Fleischpackereien gemacht.

Im Laufe der Untersuchungen besonders gefährdeter Berufsgruppen konnten aber auch Personen ermittelt werden, die eine starke allergische Hautreaktion, eine eindeutige Agglutinations- oder Komplementbildungsreaktion zeigten und dennoch einen Phagocytose-Index unter 1 hatten. Bei diesen Personen wiesen weder der Vorbericht noch der gegenwärtige Befund darauf hin, daß sie infiziert oder verdächtig waren.

Ein Jahr später (1935) folgte eine weitere Arbeit von Veazie und Meyer. Bei der Anwendung des beim Menschen durchgeführten "Brucella phagocytic index test" bei Rindern und Ziegen waren die Unterschiede zwischen normalen und infizierten Tieren nicht ausgeprägt. Während bei einer Auswahl kleiner Versuchstiere (Nager) ein positiver Index beobachtet wurde, war bei Großtieren die Phagocytose - Aktivität der Leukocyten trotz des Vorhandenseins von Brucellen im Gewebe entweder sehr gering oder sie fehlte. Der Index bei infizierten oder immunisierten Tieren war jedoch übereinstimmend hoch, wenn anstelle des Voll-Zitratblutes die sedimentierten Zellen gründlich gewaschen, in Lockes-Gelatinelösung wieder aufgenommen sowie mit frischem Serum und einer Bakterienaufschwemmung zu gleichen Teilen gemischt wurden.

Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß die Zitratlösung auf die Leukocyten der Pflanzenfresser toxisch wirkt oder auf irgendeine Weise die Phagocytose-Aktivität der Granulocyten verhindert.

Da die Zellwaschmethode für Routineuntersuchungen zu zeitraubend war, suchten Veazie und Meyer nach einem besser geeigneten Antikoagulans. Eine Anzahl Antigermitteln, eingeschlossen Na-Oxalat, Na-Fluorid, "Liquoide", Amnion-Flüssigkeit und Heparin, wurden geprüft. Heparin war am besten geeignet. Es wurde für Menschenblut eine 1 : 1000 verdünnte Lösung von Heparin in Kochsalzlösung (1 Tropfen Blut in 1 Tropfen Heparinlösung) und für Rinder und Ziegen 0,2 ccm einer Verdünnung 1 : 200 verwendet. Sonst wurde der Test genau so ausgeführt wie mit Zitratblut. Bei Vergleichsuntersuchungen mit Heparin und Zitrat als Antikoagulans wurden bei der Verwendung von Heparin bedeutend höhere Indices festgestellt. So wurden bei einer Gruppe künstlich infizierter Kühe in Zitratblut ein Index von 1,6 und in Heparinblut ein Index von 13,6 ermittelt. Bei einer Herde, die sechs Jahre lang bangfrei war, zeigte dabei auch ein Tier einen Index über 5 mit Heparinblut. Untersuchungen von Ziegen ergaben entsprechende Unterschiede. Das Vorliegen einer Infektion spiegelte sich tatsächlich regelmäßig in der Höhe der Indices wieder, vorausgesetzt, daß das Blut mit Heparin behandelt war. Experimentell infizierte Ziegen in verschiedenen Stadien des latenten Maltafiebers hatten bei Verwendung von Zitratblut einen negativen Index, während in Heparinblut die Leukocyten eine hohe Aktivität mit einem Index von 1 - 18 zeigten.

Bei den Untersuchungen von 100 Menschenblutproben waren die Unterschiede nicht so ausgeprägt. Das Verhältnis war etwa 5,8 mit Heparin gegenüber 4,3 für Zitrat. Weiterhin ergaben in manchen Fällen von fieberhaften Krankheiten, bei denen die Patienten immer einen negativen Vorbericht für Maltafieber hatten, die Blutproben einen Index, der eine latente Brucella-Infektion vermuten ließ. Während der Genesung und nach der Heilung fiel der Index jedoch ohne Ausnahme bis zu einer Höhe, die typisch für gesunde Menschen war.

Noch im selben Jahr (1935), unabhängig von dieser Arbeit, empfahlen Boerner und Mudd ebenfalls die Anwendung der Heparin-Methode.

Die Untersuchungen dieser Autoren lassen somit die Fehlermöglichkeiten des Opsonocytophagentestes deutlich erkennen. Verunreinigungen mit Säuren, Unterschiede im pH, Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Durchführung des Testes, verschieden lange Inkubationszeit u. a. können die Indices we-

sentlich beeinträchtigen. Der Test soll daher immer gleichmäßig und möglichst doppelt ausgeführt werden, solange die Faktoren, die dieses Phänomen beeinflussen, nicht näher erforscht sind.

Huddleson hat aber mit seinen Mitarbeitern Johnson und Meyer (1936) auch günstige Ergebnisse bei der Bestimmung der Phagocytosetätigkeit der Leukocyten in Rinderblut erhalten, nachdem sie die Bakterienaufschwemmung mit einer Pufferlösung, die 0,5 % BaCl_2 und 0,6 % NaCl enthielt, herstellten, und als Antikoagulans eine 12,5 %ige Na-Citratlösung, die mit einer 4,25 %igen Kochsalzlösung angemacht wurde, verwendeten. Zu 0,4 ccm Na-Citratlösung wurden 5,0 ccm Blut aufgefangen. Smetaczek (1938) zeigte, daß die Fähigkeit der weißen Blutkörperchen, Bang-Bakterien zu phagocytieren oder sich an die Bakterien anzulagern, auch beim Meerschweinchen im Reagenzglasversuch einwandfrei nachzuweisen ist. Bei geeigneter Versuchsanordnung blieben die Leukocyten bangfreier Meerschweinchen vollständig leer, während sich die Leukocyten banginfizierter oder geimpfter Tiere mit Bakterien beluden. Die Fähigkeit der Leukocyten, Bang-Bakterien in sich aufzunehmen, geht in hohem Maße mit dem Agglutinationstiter des Serums parallel. Künstlich mit Agglutininen beladene Bangbakterien wurden auch von Blut bangnegativer Meerschweinchen phagocytiert.

Opitz (1938) konnte beim Rind im Gegensatz zum Meerschweinchen wesentliche Unterschiede in der phagocytären Fähigkeit des Blutes zwischen bangfreien und banginfizierten oder geimpften Tieren nicht feststellen. Zusammenhänge zwischen Agglutinationstiter und Phagocytose waren beim Rind ebenfalls nicht nachweisbar. Ferner hat Opitz umfangreiche Untersuchungen ausgeführt, um die Empfindlichkeit des Opsonocytophagentestes gegen die verschiedensten Einflüsse festzustellen. Dabei fand er, daß Zufälligkeiten beim Auszählen (4 x 25 Leukocyten von demselben Ausstrich ausgezählt), Versuchsdauer (15 - 60 Minuten), Temperatur (38 - 45 °C), Alter der Blutproben (frisch, 10 Stunden alt, bei 10 °C aufbewahrt), Alter der Zitratlösung (frisch bis 2 Wochen alt), die Art der Zubereitung der Bakterienaufschwemmung (2-5 Tage alt, frisch und gekocht, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet u. a.), Dichte der Bakterienaufschwemmung (0,15 - 0,3 Vol %) und kleine Nießfehler (0,08 - 0,12 ccm des Zitratblutes zu 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung) die Endergebnisse kaum beeinflussen. Er nannte aber auch die von Huddleson, Johnson und Meyer empfohlene Zitratkonzentration die günstigste für die Untersuchung beim Rind.

Diernhofer (1938) gab bekannt, daß bei Meerschweinchen der phagocytäre Index weitgehend parallel mit dem Agglutinationstiter verläuft. Diese

Parallelität trifft jedoch nach seinen Untersuchungen beim Rind nicht zu.

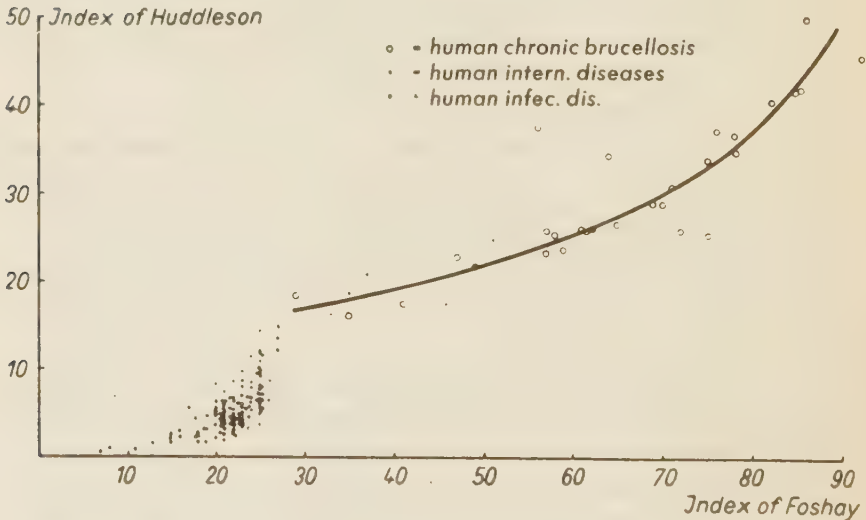
Munger, Myrtle und Huddleson berichteten noch im selben Jahr (1938), daß die M- und R-Varianten der Brucella-Arten von den segment-kernigen Leukocyten in normalem Zitratblut gesunder Menschen und Meerschweinchen phagocytiert werden. Bei den S-Formen ist das nicht oder nur in geringem Maße der Fall.

Van der Hoeden (1940) versuchte, den Opsonocytophagentest weiter zu entwickeln. Anstelle von Zitrat benützte er "Liquoid Roche". Von diesem Antikoagulans hat er erwartet, daß er die Wirkung der Normalopsonine hemmt, nicht aber die Wirkung der spezifischen Tropine (Huddleson (1933) gab das gleiche von Zitrat bekannt). Danach würden nur Leukocyten bangerkrankter Individuen die Brucellabakterien phagocytieren. Menschenblut zeigte nun zwar die erwarteten Ergebnisse, nicht aber das Blut von Rindern, Pferden und Ziegen. Im Blut der letztgenannten drei Tierarten wurde auch die spezifische Tropin-Wirkung durch Liquoid Roche aufgehoben.

In einem weiteren Versuch inaktivierte er Serum bei 50 ° C und erreichte so sein Ziel; die Opsonine wurden zerstört, als einzige die Phagocytose begünstigenden Stoffe im Serum blieben die Tropine übrig. Zu 0,1 ccm inaktivierten Serums hat er 0,1 ccm gewaschenes Zitratblut und 0,2 ccm Brucella-Bang-Suspension zugefügt. Diese Methode hat sich bei 62 Menschen, 112 Rindern und 66 Pferden als in hohem Maße spezifisch und empfindlich erwiesen.

Cotton (1953) verwendete die Huddleson-Technik zur Kontrolle bei zwei Gruppen von Kalbinnen. Beide Gruppen zählten 108 Kalbinnen, die mit dem Stamm "Buck 19" vacciniert waren, und zwar eine Gruppe intra-, die andere subkutan. Die subkutan vaccinierte Gruppe erhielt eine Dosis 25mal so groß wie die intrakutan vaccinierte Gruppe. Eine wahrnehmbare Steigerung der Phagocytose zeigte sich schon am dritten Tage nach der Impfung bei der intrakutan vaccinierten und am vierten Tage bei der subkutan vaccinierten Gruppe. Der phagocytäre Index erreichte seinen Höhepunkt bei der intrakutanen Gruppe am fünften, bei der subkutanen am sechsten Tage. Er war bei beiden Gruppen ungefähr gleich hoch und blieb auf dieser Höhe ungefähr 18 Monate lang. Nach dieser Zeit nahmen die Indices monatlich bei beiden Gruppen gleichmäßig ab. Als Antikoagulans benützte Cotton eine 12,5 %ige Na-Citratlösung, hergestellt mit physiologischer NaCl-Lösung und für die Bakterienaufschwemmung eine 47 Stunden alte Kultur einer S-Form des Brucellastammes 1119.

Parnas und Mierzejevska (1958) haben sich in Lublin mit dem Thema beschäftigt, bei Menschen und Laboratoriumstieren die Spezifität der opsonophagocytären Reaktionen bei Brucellosen sowie anderen inneren Krankheiten und akut verlaufenden Infektionskrankheiten festzustellen. Als Antigene wurden Aufschwemmungen von *Brucella brucei*, *Pasteurella tularensis*, *Pasteurella multocida* und *Escherichia coli* verwendet. Der phagocytäre Index wurde nach der Methode von Huddleson und Foshay bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, daß der phagocytäre Index für Brucellen für die chronische Brucellose spezifisch ist. Die Ergebnisse sind in der folgenden graphischen Darstellung veranschaulicht:



Gylstorff (1958) schreibt, daß die Tätigkeit der Phagocytose und die Antikörperbildung sich gegenseitig beeinflussen. In dem Augenblick, in dem die Antikörperbildung einsetzt, nimmt die Phagocytose ab. Krankheitserreger, die eine starke Phagocytose verursachen, lösen meist nur eine schwache Antikörperbildung aus. Art und Schnelligkeit der Phagocytose sind abhängig von der Tierart, der relativen Größe der RES-tragenden Organe im Verhältnis zum Gesamtgewicht, ja sogar von der Abstammung und dem Alter der Tiere (einige

Tage nach der Geburt am stärksten und dann gleichmäßig abnehmend) .

Nach Heilmeyer und Hittmaier (1957) wirken Licht, Wärme und Röntgenstrahlen phagocytosesteigernd, während Cortison, Aureomycin, Sulfathiazol, Ultraviolettstrahlen und Bewegungseinschränkung phagocytosehemmend wirken.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ziel meiner Arbeit war, die Gebrauchsmöglichkeiten des Opsonocytophagenrestes für diagnostische Zwecke und immunologische Forschungen zu untersuchen.

1. Material und Methodik

a) Vorbereitungen zur Blutentnahme

Da Blut und Antikoagulans in einem ganz bestimmten Verhältnis gemischt werden müssen, empfiehlt sich eine vorherige Markierung der Röhrchen. Diese wurde folgendermaßen vorgenommen:

Zwei Tage vor der Blutentnahme werden in jedes Röhrchen 10,8 ccm Aq. dest. eingemessen. An der Außenseite der Röhrchen wird die 10,8 ccm-Grenze mit einem Tuschering markiert und jedes Röhrchen mit einer dem Versuchstier entsprechenden Zahl versehen. Dann habe ich das Wasser ausgekippt und die offenen Röhrchen zum Trocknen in einen Brutschrank gestellt. Für Rinder habe ich Wassermann-Röhrchen verwendet. Für Meerschweinchen eignen sich auch Röhrchen von einigen ccm Inhalt mit halbgerundetem Boden, die dann entsprechend markiert werden müssen.

b) Bakteriensuspensionen

Für den Test verwendete ich den von Cotton empfohlenen Brucella-Stamm 1119. Dieser Laboratoriumsstamm ist nur wenig pathogen. Die Züchtung erfolgte auf Traubenzucker-Glycerin-Agar. Da die Brucellen zu jenen Bakterien gehören, die eine Dissoziationsfähigkeit besitzen, ist es notwendig, vor der Überimpfung eine S-Kolonie zu isolieren; denn nach Huddleson werden die R- und M-Formen auch von den Leukocyten gesunder Individuen phagocytiert. Die Differenzierung der Kolonien erfolgte

1. in der Henry'schen Beleuchtung.

S-Kolonien erscheinen im Plattenmikroskop dabei blau-grün,
R- und M-Kolonien mehr gelb.

2. Mittels der Trypaflavinagglutination.

Die in S-Kolonien gewachsenen Bakterien werden von einer 0,1 %igen Trypaflavinlösung nicht agglutiniert, während die von M- und R-Kolonien spontan agglutininieren.

Von einer auf Platten gezüchteten S-Kolonie überimpfte ich dann mit Hilfe einer Öse eine kleine Menge Brucellen in Zickzacklinie auf ein Röhrchen Traubenzucker-Glycerin-Schrägagar. Diese letzte Überimpfung nahm ich immer 48 Stunden vor dem vorgesehenen Test vor. Unmittelbar vor dem Test wurden auf die 48 Stunden alte Kultur 2 ccm einer Pufferlösung pipettiert, die aus 0,6 % NaCl und 0,5 % BaCl₂ hergestellt und auf pH 7 eingestellt war. Unter leichtem Schütteln wusch ich dann den Bakterienrasen von dem Nährboden ab und füllte die Keimsuspension, sobald sie ein milchig-wäßriges Aussehen annahm, in ein Reagenzglas ab. Dieses wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu erhalten, noch eine halbe Minute vorsichtig weitergeschüttelt.

c) Antikoagulans

Als Antikoagulans habe ich beim Rind eine 12,5 %ige, beim Meerschweinchen eine 1,6 %ige Natriumcitratlösung (beide mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt) verwendet. Beim Rind gibt man 10 ccm Blut auf 0,8 ccm Citratlösung, beim Meerschweinchen zwei Tropfen Blut auf zwei Tropfen Citratlösung.

d) Die Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte beim Rind aus der Vena jugularis in Röhrchen, in denen sich 0,8 ccm der 12,5 %igen Natrium-Citratlösung befanden. Es wurde zu dieser soviel Blut eingelassen, daß die Oberfläche gerade bis zum Tuschering reichte (10 ccm). Das Blut ließ ich an der Innenwand der Röhrchen entlangfließen, um eine Schaumbildung zu vermeiden. Die Röhrchen wurden mit einwandfrei sauberen Gummistöpseln verschlossen und dann zur Mischung von Citratlösung und Blut einige Male langsam um ihre Querachse geneigt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blutproben im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei Meerschweinchen entnahm ich das benötigte Blut aus einem Ohrge-

faß. Um das Ohr zu reinigen und die Gefäße gut sichtbar zu machen, reibt man es mit in Alkohol getränktem Zellstoff ab. Nachdem die Ohrgefäße eine genügende Hyperämie zeigten, wurde das Ohr trockenzerieben. Mit einer entsprechend kleinen sterilen Nadel stach ich in ein Blutgefäß am Ohrrand ein. Von dem aus der kleinen Wunde hervorquellenden Blut wurden zwei Tropfen in dem vorbereiteten Röhrchen, das zwei Tropfen 1,6 %iger Citratlösung enthielt, aufgefangen und vorsichtig gemischt.

e) Der eigentliche Test.

Beim Rind füllte ich in saubere Wassermann-Röhrchen 0,1 ccm des Citratblutes ein und gab dann 0,1 ccm der Bakterienaufschwemmung dazu. Das Pipettieren erfolgte mit in zehn gleiche Teile eingeteilten 1 ccm-Pipetten.

Beim Meerschweinchen goß ich das Citratblut einfach in Wassermann-Röhrchen um und gab zwei Tropfen der Bakterienaufschwemmung dazu.

Die Röhrchen wurden dann verschlossen, durch vorsichtiges, langsames Schütteln Blut und Bakterien gut miteinander vermischt und alsdann in ein Wasserbad von 38° C gestellt. Nach 30 Minuten wird das Blut-Bakterien-Gemisch aus dem Wasserbad genommen, und es werden Ausstriche auf Objektträgern vorgenommen. Trotz der starken Sedimentierung erfolgte die Anfertigung der Ausstriche ohne weiteres Schütteln. Dazu brachte ich mittels 0,1- bzw. 1 ccm-Pipetten auf einen mit Alkohol gründlich gereinigten Objektträger ein kleines Tröpfchen des Blut-Bakteriengemisches und fertigte mit Hilfe von geschliffenen Deckgläsern nach der in der Hämatologie üblichen Methode gleichmäßige Ausstriche an. Vorsichtshalber wurden alle Ausstriche doppelt angefertigt. Die Präparate wurden dann gekennzeichnet und bei Zimmertemperatur luftgetrocknet.

Die Färbung der Ausstriche erfolgte nach Pappenheim. Bei dieser panoptischen Methode sind die Farbunterschiede der verschiedenen Elemente so groß, daß ihre Erkennung sehr leicht fällt. Ich habe die vorgenannte Methode mit einer kleinen Abänderung durchgeführt, 1.) die Präparate wurden mit Eosin-Methylenblau-Lösung (Merck) 3 Minuten gefärbt und dann die Farblösung ohne Spülung abgekippt; 2.) die Ausstriche wurden danach mit einem Gemisch der obigen Lösung und Aq. dest. im Verhältnis 1 : 1 bedeckt und eine weitere Minute gefärbt. Anschließend wurde diese Lösung wieder ohne Spülung vom Präparat entfernt. 3.) Die Präparate wurden mit frisch hergestellter verdünnter, wäßriger Giemsa-Lösung (1 Tropfen Lösung auf 1 ccm Aq. dest.)

15 Minuten lang gefärbt. Nach Abgießen der Lösung wurde jedes Präparat gründlich mit Aq. dest. gespült, mit Hilfe von einfachen Wäscheklammern auf eine Kante gestellt und so bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. An der Unterseite der Objektträger haftende Farbe wurde mit Alkohol entfernt.

Die Differenzierung der Leukocyten erfolgte nach den Angaben von Wirth. Zu beachten war, daß Meerschweinchen keine segmentkernigen neutrophilen Leukocyten, sondern stark granulierte sog. Pseudoeosinophile besitzen, die jedoch funktionell den segmentkernigen neutrophilen Leukocyten der anderen Tiere entsprechen.

Die phagocytierten Brucellen, die sich bei der panoptischen Färbung nach Pappenheim intensiv dunkelblau färben, waren in dem blauröt gefärbten Plasma der neutrophilen Leukocyten, wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, deutlich zu erkennen.

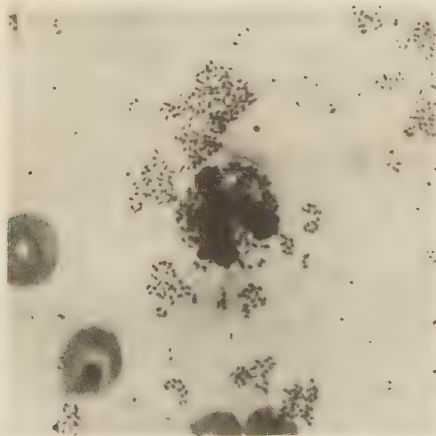


Abb. 1 Rinderleukocyt mit
phagocytierten
Brucellen

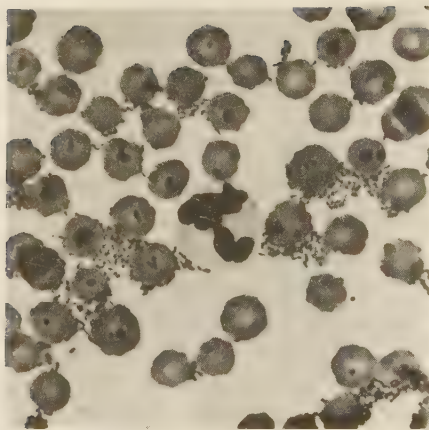


Abb. 2 Rinderleukocyt ohne
Phagocytoseaktivität

Die Berechnung des phagocytären Index wurde folgendermaßen vorgenommen: Unter dem Mikroskop wurden in 20 segmentkernigen neutrophilen Leukocyten die phagocytierten Bakterien pro Zelle einzeln gezählt. Die Summe der insgesamt aus 20 Leukocyten ermittelten Brucellen wird durch 20 dividiert, und man erhält auf diese Weise den arithmetischen Mittelwert pro Zelle, den man den phagocytären Index nennt. Wäre die Zahl der von 20 Leukocyten einverleibten Brucellen z. B. 242, so könnte man den phagocytären Index in der Formel

$$\text{P. I.} = \frac{242}{20} = 12,1$$

darstellen.

War die Zahl der phagocytierten Bakterien in einem Leukocyt über 40, habe ich als höchste Zahl nur 40 genommen, da eine Auszählung von mehr Keimen erfahrungsgemäß nahezu unmöglich und ungenau ist.

f) Tiermaterial

Die Meerschweinchen wurden vor Beginn der Versuche auf Bangfreiheit mittels Langsamagglutination untersucht. Für die Versuche wurden 30 junge geschlechtsreife Tiere verwendet, die sich in gutem Gesundheitszustand befanden. 10 Meerschweinchen sind mit dem Totimpfstoff nach Lembke (1/10 der Rinderdosis) durch 1malige subkutane Injektion schutzgeimpft worden. 10 Meerschweinchen wurde subkutan eine handelsübliche, aber 1 : 10 verdünnte Buck 19-Vakzine (Behringwerke) verabreicht. Die Injektionsdosis (1 ccm) enthielt ca. 600 Mill. lebende Brucellen. 10 weitere Meerschweinchen wurden mit einem virulenten Brucellenstamm (544 Weybridge), und zwar mit 15 Mill. Keimen, subkutan infiziert. Diese Dosis löst auch beim Rinde nach künstlicher Infektion Aborte aus. Die Zählung der Keime erfolgte nach einer Methode, wie sie Meyn und Schrinner beim Rinde beschrieben haben.

Die Bestimmung des Opsonocytophagen-Indexes erfolgte bis zum 11. Tage täglich, später in wöchentlichen Abständen.

Die Rinder stammten alle aus tuberkulose- und bangfreien Beständen. Vor Beginn der Versuche fiel die Tuberkulinprobe bei allen Tieren negativ aus. Langsamagglutination und Komplementbildungsreaktion für Brucellose ergaben ebenfalls negative Ergebnisse.

Zu dem Versuch standen 36 Tiere zur Verfügung. Alle Rinder gehörten der grau-braunen Höhenviehrasse (Allgäuer an, waren weiblichen Geschlechts und annähernd gleichen Alters.

12 Rinder im Alter von 5 - 7 Monaten sind 2mal im Abstand von 4 Wochen mit 5 ccm des Totimpfstoffes nach Lembke subkutan am Trier schutzgeimpft worden.

12 weitere Rinder erhielten im Alter von 5 - 9 Monaten 2mal im Abstand von 4 Wochen je 30 Milliarden lebende Keime des Stammes Buck 19 (Lebendimpfstoff der Behringwerke) subkutan verabreicht.

12 weitere nicht schutzgeimpfte Rinder dienten als Kontrollen.

Sämtliche Rinder standen in einem vom Tierhygienischen Institut durchgeführten Großversuch über die Frage der Immunisierung gegen Brucellen. Sie wurden nach Eintritt der Geschlechtsreife gedeckt und im 4. - 5. Trächtigkeitsmonat konjunktival mit 15 Millionen Keimen des Brucellastammes 544 (Weybridge) infiziert. Nähere Einzelheiten über diese Versuche sind von Meyn und Schrinner bereits veröffentlicht worden.

Die Bestimmung des Opsonocytophagen-Index wurde bei den schutzgeimpften Tieren ca. 10 - 12 Monate nach der Immunisierung und bei allen Tieren einschließlich der Kontrollen ca. 7 - 8 Monate vor der künstlichen Infektion begonnen und in monatlichen Abständen bis zum Verwerfen bzw. der normalen Geburt weitergeführt.

2. Untersuchungsergebnisse

a) Meerschweinchenversuche

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 1 - 3 zusammengestellt worden.

Nach dem Abschluß des Opsonocytophagentestes wurden alle Meerschweinchen getötet und die Agglutinationstiter des Blutserums auf Brucellose festgestellt. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 4 zu ersehen.

Tabelle 1

Untersuchungsergebnisse bei 10 mit Lembke-Totimpfstoff geimpften Me

Zeit	Phagocytose-Index bei Tier Nr.			
	1	2	3	4
1 Tag vor der Schutzimpfung	0.3	0.5	0.4	0.5
Tage nach der Schutzimpfung				
1	0.6	0.7	2.2	0.5
2	0.8	0.5	1.7	0.7
3	1.3	0.5	1.2	0.8
4	2.7	1.4	1.8	1.5
5	2.2	2.0	2.0	1.1
6	3.0	7.8	3.5	4.4
7	2.5	15.7	2.3	11.6
9	4.1	2.4	2.5	9.0
11	1.2	1.9	1.3	4.1
14	0.5	1.5	0.9	0.1
18	0.4	0.6	0.2	0.2
25	15.2	1.7	1.5	0.8
32	11.9	2.4	4.4	2.0
39	15.4	11.1	9.0	1.8
46	3.0	2.7	9.3	3.0
53	5.1	0.4	2.3	3.5
60	0.7	14.5	1.2	1.0
67	7.0	6.7	1.3	12.3
74	2.4	1.5	1.5	15.8
81	1.8	2.7	0.4	5.8
88	0.6	1.3	0.4	0.5
95	0.3	0.4	0.4	0.3
102	7.3	3.0	1.8	1.6

erschweinchen

5	6	7	8	9	10
0.6	1.1	0.4	0.4	0.4	0.3
0.7	0.5	1.0	0.7	1.0	0.3
0.6	0.8	1.3	0.7	1.3	0.4
0.8	1.0	1.2	0.7	1.3	0.6
1.1	1.0	2.3	12.6	1.7	1.2
2.0	1.0	1.8	2.5	1.8	2.4
2.6	3.4	3.4	4.4	4.5	3.2
3.5	9.7	2.3	8.2	9.3	10.9
3.8	5.8	1.3	7.2	3.1	2.2
0.7	1.8	0.9	3.1	1.4	0.5
0.7	0.3	0.3	0.5	0.9	0.8
4.8	0.4	0.4	2.7	0.2	0.5
3.9	1.3	1.2	3.8	0.9	0.4
5.8	3.6	16.8	12.6	2.0	2.4
14.0	2.2	28.9	15.1	7.4	27.9
2.3	1.5	2.8	12.2	4.1	5.8
0.7	0.7	7.3	2.8	2.5	13.2
0.1	0.3	11.7	7.5	1.1	22.1
7.9	0.6	4.4	9.8	1.2	12.8
0.3	0.8	0.3	1.9	1.0	27.2
0.5	0.4	0.3	11.4	0.4	23.3
0.3	0.5	0.5	0.4	0.1	4.7
0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	5.6
0.2	0.7	2.4	0.6	1.4	7.5

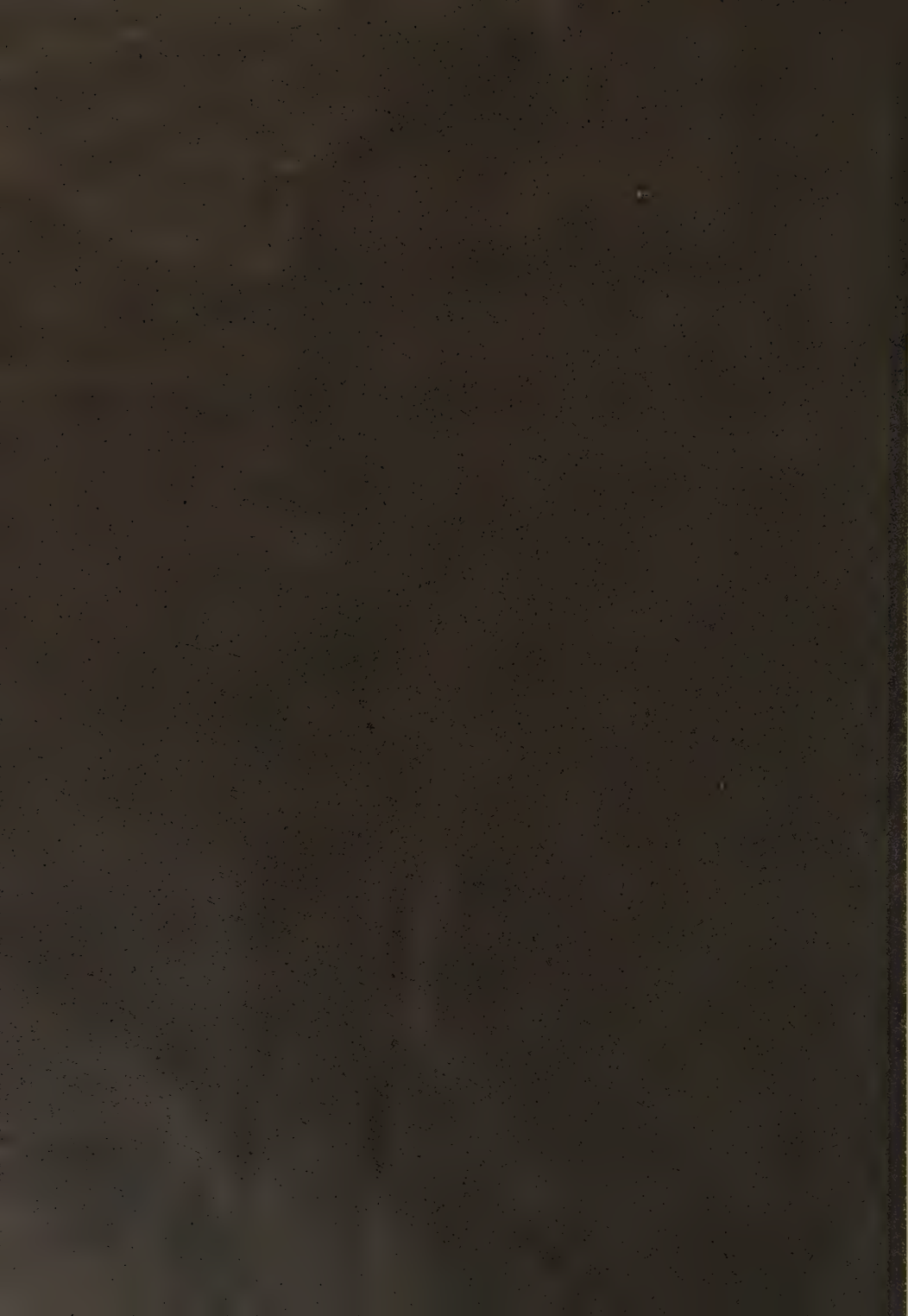


Tabelle 2

Untersuchungsergebnisse bei 10 mit Lebendimpfstoff Buck 19 geimp

Phagocytose-Index bei Tier Nr.

Zeit	11	12	13	14
1 Tag vor der Schutzimpfung	0.0	0.3	0.2	0.1
Tage nach der Schutzimpfung				
1	0.3	0.8	0.2	0.3
2	0.7	0.8	0.8	0.5
3	1.2	0.9	1.0	1.1
4	0.9	2.9	1.8	0.9
5	3.1	2.2	29.6	12.5
6	17.0	14.0	16.2	0.8
7	3.2	20.7	24.4	16.9
9	2.8	2.2	6.8	15.5
11	21.0	19.2	8.0	17.7
14	17.1	3.5	6.9	7.9
18	21.8	14.1	22.0	17.6
25	19.0	16.0	18.7	14.6
32	8.5	17.7	15.9	7.4
39	4.7	12.0	6.9	5.0
46	1.7	9.2	5.3	0.3
53	5.5	6.7	6.7	3.2
60	3.5	5.8	8.8	2.8
67	1.3	2.2	4.5	0.8
79	0.4	3.1	7.8	3.5
81	0.4	0.2	2.4	2.3
88	0.4	0.9	0.8	1.1
95	0.2	0.1	0.3	0.7
102	0.2	-	0.0	0.0

en Meerschweinchen

15	16	17	18	19	20
0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.2
0.3	0.3	0.4	0.1	1.0	0.6
0.4	0.7	1.0	2.1	2.5	0.8
0.9	0.8	1.1	2.0	0.8	0.7
1.0	1.4	1.0	0.9	3.1	6.4
1.9	16.4	7.0	24.4	8.5	11.4
3.3	17.0	5.4	13.4	10.8	14.1
20.4	5.7	17.7	2.8	13.1	5.7
16.5	8.3	13.8	8.2	10.9	8.7
9.6	19.0	19.7	15.0	18.6	18.3
16.7	17.6	21.9	15.4	17.6	12.9
18.0	19.7	21.2	18.4	17.4	20.1
16.0	18.4	19.3	11.7	17.4	6.0
18.0	13.1	10.5	10.9	11.4	7.5
5.1	8.6	3.2	10.4	10.0	2.8
2.7	8.1	4.4	3.0	4.9	9.2
5.7	10.1	5.2	0.7	0.8	3.8
7.8	13.1	7.8	2.6	1.5	0.8
0.7	12.0	0.4	2.2	10.2	2.3
0.7	9.8	2.5	2.3	1.7	0.2
0.7	10.2	1.0	1.3	0.4	0.1
0.3	13.9	0.8	0.3	0.3	0.3
0.3	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0
0.0	0.7	0.1	0.0	0.1	0.2

Tabelle 3

Untersuchungsergebnisse bei 10 mit *Brucella abortus* Stamm 544 infiz

Phagocytose-Index bei Tier Nr.				
Zeit	21	22	23	24
1 Tag vor der Schutzimpfung	0.5	0.6	0.3	0.4
Tage nach der Schutzimpfung				
1	1.5	4.5	0.8	0.8
2	0.9	4.2	1.1	0.7
3	1.4	3.8	1.6	0.2
4	1.1	10.2	2.4	1.2
5	1.1	1.3	4.2	1.1
6	1.2	3.2	7.1	0.0
7	5.1	7.7	4.6	1.1
9	8.1	0.2	10.5	1.5
11	0.1	9.1	3.0	3.5
14	5.6	26.0	28.3	18.2
18	6.0	25.6	33.6	31.7
25	12.3	23.2	20.8	22.5
32	25.0	18.8	27.2	26.1
39	28.6	20.4	26.8	18.2
46	27.4	29.9	28.0	6.5
53	31.2	33.1	37.3	21.1
60	23.0	23.0	19.7	15.8
67	24.5	24.2	21.1	16.7
74	20.6	22.6	19.5	9.8
81	17.3	11.3	16.6	11.2
88	12.5	11.6	20.2	17.4
95	10.7	7.5	16.7	7.6
102	11.8	10.5	14.8	12.0

erten Meerschweinchen

25	26	27	28	29	30
0.4	0.8	0.6	0.2	0.3	0.3
6.4	6.6	9.4	1.3	1.3	1.3
2.5	2.6	2.6	1.0	0.4	3.0
0.3	2.3	0.8	0.8	0.4	0.4
0.4	1.3	0.6	0.5	0.7	0.6
1.0	3.3	1.9	1.1	0.8	0.4
1.4	1.1	1.1	1.7	1.7	0.4
0.6	0.8	1.1	4.9	4.5	0.7
13.0	1.7	1.7	3.7	4.7	0.8
5.5	4.8		1.8	1.1	6.9
23.4	29.6		3.9	1.1	5.1
32.4	23.8		22.3	10.5	14.2
22.1	13.9		20.7	25.1	15.3
33.8	14.7		9.0	33.5	16.4
29.0	29.0		3.4	34.0	18.6
20.1	22.8		12.9	17.8	6.8
19.9			12.3	18.5	7.4
18.0			14.4	22.1	
			21.7	21.7	
			13.7	10.6	
8.0			14.9	10.3	
12.4			12.0	8.5	
9.4			3.5	10.1	
15.7				13.9	

Tabelle 4

Ergebnisse der Blutserumlängsamagglutination nach Abschluß d

0 = nicht untersucht

- = kein Titer

+ = positiver Titer

Nr. der Meerschw.	Art der Vorbehandlung	Agglutinationstiter b	
		1 : 20	1 :
1	Impfung mit	-	-
2	Totimpfstoff	-	-
3		-	-
4	getötet nach	-	-
5	109 Tagen	-	-
6		-	-
7		-	-
8		-	-
9		-	-
10		-	-
11	Impfung mit	++++	++
12	Buck 19	0	0
13		++++	++
14	getötet nach	++++	++
15	140 Tagen	++++	++
16		++++	++
17		++++	++
18		+++	++
19		++++	++
20		-	-
21	Infektion mit	++++	++
22	Stamm 544	++++	++
23		++++	++
24	getötet nach	++++	++
25	140 Tagen	++++	++
26		0	0
27		0	0
28		0	0
29		++++	++
30		0	0

er Phagocytoseversuche

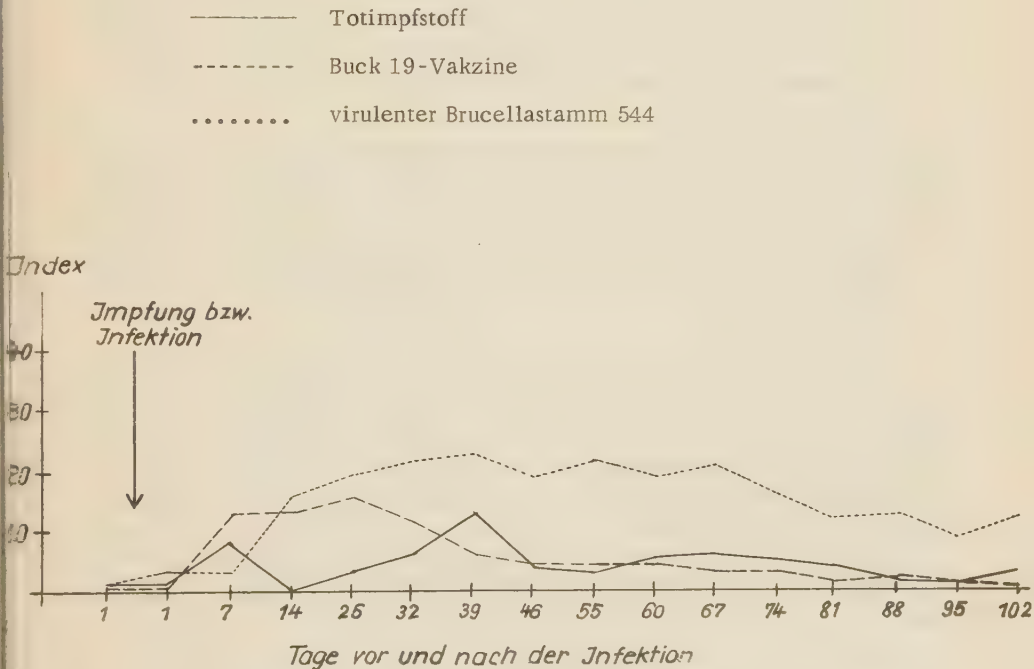
Bei Serumverdünnung

[illegible]

b) Besprechung der Meerschweinchenversuche

In Abb. 3 sind die Untersuchungsergebnisse zusammenfassend graphisch dargestellt worden.

Abb. 3 Vergleichende Darstellung des Verlaufes der Phagocytose-Index-Kurven bei Meerschweinchen



Der Kurvenverlauf zeigt deutlich, daß die Infektion mit dem virulenten Brucellastamm 544 praktisch während der ganzen Beobachtungsdauer einen fast gleichbleibend hohen Phagocytose-Index hervorrief. Im Gegensatz dazu erreichte die Phagocytoseaktivität bei den schutzgeimpften Tieren weder die- selbe Höhe noch hielt sie solange an. Ein Ansteigen des Indexes war allerdings bereits einige Tage früher als bei den infizierten Tieren zu bemerken.

Im Beginn der Immunisierung zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen dem Totimpfstoff und der Lebendvakzine. Der durchschnittliche Höhepunkt der Phagocytoseaktivität trat bei den mit dem Totimpfstoff behandelten Tieren erst nach 39 Tagen ein, bei den mit Lebendimpfstoff schutzgeimpften Tieren wurde derselbe Indexwert schon nach 7 Tagen erreicht. Auffallend ist auch, daß nach der Verabreichung von Totimpfstoff sehr viel größere individuelle Schwankungen bei den einzelnen Tieren der Versuchsgruppe zustande kamen als bei den mit Buck 19-Keime geimpften Tieren. Nimmt man den Grad der Phagocytoseaktivität als Gradmesser für eine eingetretene Schutzwirkung, dann ergibt sich somit für die erstere Gruppe auch eine sehr viel schwankendere Immunität.

Diese Tatsache scheint auch durch die Ergebnisse der Langsamagglutination in gewissen Grenzen bestätigt zu werden. Agglutinierende Antikörper sind zwar nicht mit Immunantikörpern identisch, das vollkommene Fehlen von Agglutininen im Serum der mit Totimpfstoff geimpften Meerschweinchen deutet aber zweifelsohne auch auf das nahezu völlige oder ganze Fehlen von Immunantikörpern hin.

Unterschiede zeigten sich auch im Krankheitsverlauf. Von den mit dem Totimpfstoff nach Lembke schutzgeimpften Tieren zeigten 14 Tage nach der Impfung 8 Tiere (Nr. 2 - 9) erbsengroße Abszesse an der Impfstelle. Die Heilung war bei allen diesen Tieren am 25. Tage nach der Injektion vollendet. Bei weiteren 2 Tieren (Nr. 1 und 10) erreichten die Abszesse an der Impfstelle nach 14 Tagen Bohnengröße. Eine völlige Heilung trat bei Tier Nr. 1 am 39. Tage ein. Bei Tier Nr. 10 brach der Abszeß am 88. Tage nach außen durch und heilte im Verlauf weiterer 14 Tage vollständig ab. Tier Nr. 1 brachte 90 Tage nach der Impfung zwei gesunde Junge, Tier Nr. 4 100 Tage nach der Impfung drei gesunde Junge zur Welt.

Nach der Impfung mit dem Lebendimpfstoff Buck 19 zeigten einige Tage nach der Impfung alle Tiere mehrtägige Mattigkeit und Fraßunlust.

Am 67. Tage nach der Impfung abortierte Tier Nr. 13. Die Früchte waren noch unbehaart (Meerschweinchen werden behaart geboren, Dauer der Trächtigkeit 9 Wochen). Ein weiteres Weibchen (Nr. 12) gebar 87 Tage nach der Impfung zwei gesunde Junge, starb aber 12 Tage später in stark abgemagertem Zustand. Die Sektion zeigte eine starke Schwellung der Leber und stecknadelbis hirsekorngroße graugelbe nekrotische Herde in diesem Organ.

Im 3. Monat nach der Impfung zeigten 2 Tiere (Nr. 15 und 18) starke cylindri-

sche Verdickungen der Vorderextremitäten.

Die mit *Brucella abortus* Stamm 544 (Weybridge) infizierten Tiere zeigten schon an dem der Infektion folgenden Tage starke Benommenheit und Freßunlust. Am 11. Tage p. i. verendete 1 Tier (Nr. 27).

Am 18. Tage p. i. waren die Kniefaltenlymphknoten bei allen Tieren, mit Ausnahme von Tier Nr. 21, erbsen- bis bohnen groß, nach 7 weiteren Tagen bestanden diese Schwellungen der Lymphknoten nur noch bei Nr. 26, 28 und 30. 56 Tage p. i. verendete Tier Nr. 26. Die Sektion ergab einen haselnußgroßen Abszeß in der Leber. 59 Tage p. i. verendete Nr. 30. Bei der Sektion entleerten sich aus der Bauchhöhle ca. 20 ccm einer kakaofarbenen Flüssigkeit. Außer einer Peritonitis bestand eine Metritis mit Rötung und Vergrößerung des Uterus. 99 Tage p. i. verendete Nr. 28. Eine Sektion wurde nicht durchgeführt. 101 Tage p. i. gebar Nr. 22 zwei gesunde Junge. Im 3. Monat nach der Infektion zeigten 4 Tiere (Nr. 22, 24, 28, 29) starke cylindrische Auftreibungen an den Extremitäten. Bei 3 Tieren kam es nach etwa 50 Tagen zu einer mit völliger Linsentrübung einhergehenden inneren Augenentzündung.

Zusammenfassend ergaben die Meerschweinchenversuche folgendes:

1. Gesunde Meerschweinchen besitzen immer einen negativen oder sehr niedrigen phagocytären Index. Nach einer Infektion mit Brucellen steigt der Index schon nach wenigen Tagen an. Die weitere Phagocytoseaktivität verhält sich dabei proportional zu der Pathogenität des Infektionsstammes.
2. Die Schutzimpfung mit Lebendimpfstoff Buck 19 rief im Durchschnitt einen höheren und konstanteren Phagocytose-Index hervor als die Impfung mit Totimpfstoff nach Lembke.
3. Beim Meerschweinchen kann der Opsonocytophagentest unter Umständen auch zur Diagnose einer Brucellainfektion verwendet werden.

c) Rinderversuche

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 5 und 6 zusammengestellt worden. Bei den eingerahmten Zahlen auf der rechten Seite der Tabelle 5 handelt es sich um die nach der künstlichen Infektion ermittelten Indexe.

Tabelle 5

Opsonocytophagentest bei künstlich mit Stamm 544 infizierten trächtigen

Tier Nr.	Vorbehandlung	Phagocytärer Index - Datum der Untersuchungen					
		30.9.57	28.10.57	21.11.57	16.12.57	28.1.58	24.
1	Totimpfstoff	21.6	8.4	15.7	2.7	4.6	4.
2	nach Lembke	33.5	11.4	39.7	11.2	18.4	4.
3	Oktober 1956	13.0	3.2	9.4	18.5	9.4	4.
4		15.0	20.7	37.1	14.3	5.1	2.
5		38.0	33.6	27.3	5.2	4.2	8.
6		29.9	27.5	31.5	26.1	14.6	5.
7		23.5	11.5	29.7	26.5	17.2	8.
8		5.7	4.4	11.4	3.0	16.4	3.
10		37.0	17.4	34.2	22.9	14.5	9.
11		40.0	40.0	38.8	9.1	18.1	13.
12		10.8	8.4	35.9	8.8	11.1	7.
14	Lebendimpfstoff	39.8	30.8	30.7	27.1	26.4	12.
15	Buck 19	40.0	35.2	39.7	27.5	29.5	8.
16	Januar 1957	36.6	11.1	26.2	26.0	20.7	4.
17		39.7	34.2	38.7	10.7	30.8	21.
18		38.8	36.1	39.8	33.8	37.6	4.
24		39.5	35.5	34.8	17.5	28.5	14.
25	Nicht geimpfte Kontrollen		0.4	0.6	13.1	8.8	1.
26			0.2	0.1	0.1	0.0	0.
28			0.0	0.2	0.0	4.6	0.
29			0.1	5.9	21.9	11.9	2.
30			0.0	0.3	0.4	0.9	0.
31			0.0	4.3	0.0	0.1	0.
32			1.1	5.3	3.5	3.3	0.

Kalbinnen

58	23.3.58	28.4.58	29.5.58	27.6.58	28.7.58	23.8.58	22.9.58	20.10.58
10.1	18.0	11.5	10.8	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
22.4	28.6	28.8	39.3	40.0	39.2	39.2	40.0	40.0
15.7	14.6	22.6	20.3	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
26.3	20.3	10.4	16.7	37.5	38.2	40.0	26.2	
31.6	29.0	40.0	40.0	-	-	-	-	
17.7	20.7	13.9	22.5	39.8	40.0	40.0	-	
12.0	21.6	39.2	40.0	-	-	-	-	
22.5	12.7	9.4	14.6	40.0	39.5	-	-	
16.3	33.4	35.1	40.0	39.9	40.0	40.0	-	
19.2	28.5	34.1	35.6	39.5	25.5	37.1	29.2	
27.3	28.5	35.2	39.0	40.0	-	-	-	
35.1	34.2	39.4	39.4	38.6	39.3	39.6	39.5	
38.6	40.0	37.8	40.0	39.4	40.0	40.0	39.4	
26.9	27.2	30.9	38.2	35.1	34.8	34.5	39.4	
35.0	38.2	29.6	39.1	38.5	32.2	38.9	40.0	
37.8	37.2	34.8	38.9	40.0	40.0	40.0	40.0	
25.9	35.4	38.0	31.4	36.3	34.8	38.7	40.0	
7.8	1.4	15.2	10.6	22.1	17.3	10.0	39.0	
0.3	0.2	-	-	-	-	-	-	
0.8	0.1	12.5	16.3	36.3	40.0	40.0	-	
29.3	26.7	32.1	27.2	40.0	40.0	40.0	40.0	
14.4	15.7	39.0	40.0	40.0	-	-	-	
10.7	3.3	39.2	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	
5.9	6.6	40.0	40.0	40.0	-	-	-	

Tabelle 6

Opsonocytophagentest bei schutzgeimpften und nichtinfizierten Kalbinn

		Phagocytyärer Index - Datum der Untersuchungen				
Tier Nr.	Vorbehandlung	30.9.57	28.10.57	21.11.57	16.12.57	28.1.58
Totimpfstoff nach Lembke						
9	Oktober 1956	14.0	10.8	35.3	4.8	4.2
Lebendimpfstoff Buck 19						
13	Januar 1957	39.3	35.2	35.8	21.7	27.5
19		39.3	40.0	35.5	26.3	36.5
20		37.6	28.7	26.9	10.3	5.9
21		16.1	2.5	20.6	7.7	10.2
Nicht geimpfte Kontrollen						
27			0.1	0.1	0.1	17.0
33			0.0	0.3	1.6	8.9
34			0.1	2.0	0.9	1.6

n und Kontrollen

2.58 23.3.58 23.4.58 29.5.58 27.6.58 28.7.58 23.8.58 22.9.58 20.10.58

9 19.2 23.1 18.5 27.1 21.2 40.0 40.0 40.0

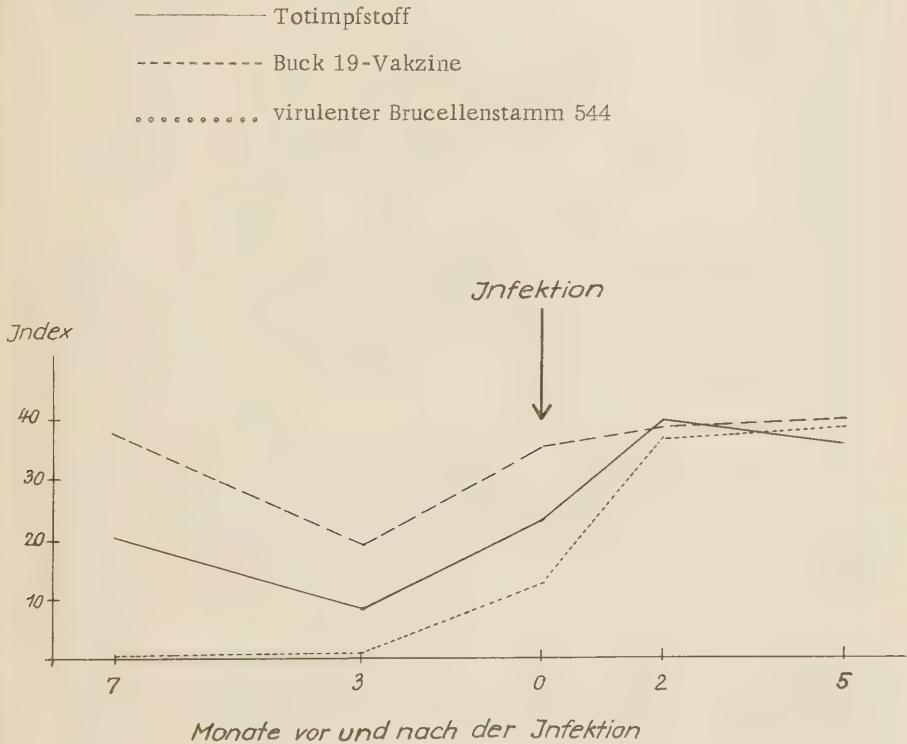
2 26.8 38.5 36.9 34.4 38.0 32.8 38.1 36.8
 8 32.4 35.5 37.0 38.3 36.2 40.0 34.5 39.5
 7 23.7 32.8 25.3 38.8 35.9 33.8 39.1 38.0
 9 5.1 33.0 29.4 37.9 36.1 34.9 39.0 39.7

0 0.3 2.4 10.7 2.2 9.1 37.8 40.0 38.7
 0 0.3 5.5 18.8 13.4 21.6 17.7 31.0 31.5
 1 6.7 3.5 10.8 9.4 20.6 12.8 24.2 19.8

d) Besprechung der Rinderversuche

In Abbildung 4 sind die Untersuchungsergebnisse bei Tieren, die bis zum Abschluß dieser Arbeit infiziert wurden (Tabelle 5), unter Zugrundelegung der arithmetischen Mittelwerte graphisch dargestellt worden.

Abb. 4 Vergleichende Darstellung des Verlaufes der Phagocytose-Index-Kurven bei Rindern



Der Kurvenverlauf läßt deutlich erkennen, daß bei den schutzgeimpften Rindern beider Gruppen Monate nach der Immunisierung noch eine gesteigerte Phagocytoseaktivität vorhanden war. Die erreichten Werte waren bei den mit Buck 19 geimpften Tieren höher als bei den mit Totimpfstoff behandelten Rindern. Ebenso wie bei den Meerschweinchen zeigten auch die mit der Adsorbat-Vakzine geimpften Tiere ein viel uneinheitlicheres Verhalten als die Tiere der

Buck 19-Gruppe. Das ergibt sich eindeutig aus einem Vergleich der beiden Impfgruppen in Tabelle 5.

Besonders auffallend ist die Erscheinung, daß - und zwar in beiden Gruppen - die Phagocytose-Indexe ungefähr vor Beginn der Trächtigkeit ihren niedersten Stand hatten und dann bis zum Zeitpunkt der Infektion im 5. Trächtigkeitsmonat spontan und kontinuierlich wieder anstiegen. Man könnte vermuten, daß dieser Anstieg mit der bekannten Affinität der Brucellen zum trächtigen Uterus in Verbindung steht und somit vielleicht Ausdruck eines immunbiologisch bedeutsamen Vorganges ist. Diese Vermutung erweist sich aber als nicht ganz richtig. Einerseits ist es nämlich bei den nicht geimpften Kontrollen nach Eintritt der Trächtigkeit ebenfalls zu einem - wenn auch nicht ganz so hohen - Anstieg des Phagocytose-Index gekommen, und andererseits zeigt der Ausgang der Versuche deutlich, daß zwischen der Schutzwirkung beider Vakzinen ein sehr deutlicher Unterschied besteht. Das Ansteigen der Phagocytoseaktivität muß also in erster Linie zunächst auf den Einfluß der eingetretenen Trächtigkeit zurückgeführt werden. Daß die Immunitätslage vielleicht doch von einer gewissen Bedeutung war, läßt sich nur mit der Höhe des Phagocytose-Index erklären, der bei den mit Buck 19 geimpften Tieren sehr viel höher war als bei den mit Totimpfstoff behandelten Rindern.

Versucht man, den Opsonocytophagentest auch in diagnostischer Hinsicht zu verwerten, dann ergibt sich folgendes: Bei Jungrindern ist der Test mit großer Sicherheit anwendbar. Bei Tieren, die ein Alter von zwei Jahren erreicht oder dieses Alter überschritten haben, sind aber nur negative oder sehr niedrige Indices als zuverlässig zu werten. Solche Tiere können als bangfrei angesehen werden.

Andererseits besagt ein hoher Index aber nicht, daß das Tier wirklich mit Brucellen infiziert ist. Nach einem Alter von ca. 2 Jahren zeigen nämlich auch manche bangfreien Rinder einen hohen phagocytären Index. Er kann manchmal so hoch sein, daß er von einem immunitäts- oder infektionsbedingten Index nicht zu unterscheiden ist.

Es ist jedoch nicht so, daß mit einem fortgeschrittenen Alter jedes Rind einen hohen phagocytären Index bekommt. Ich habe z. B. zwei ca. 8 Jahre alte bangfreie, künstlich mit Geflügeltuberkelbakterien infizierte Kühe 6 Monate lang 4wöchentlich untersucht. Die beiden Kühe zeigten nie einen Index über 7. Die Befunde von Parnas und Mierzejevskaja, die bei Menschen und kleinen Versuchstieren eine unspezifische, erhöhte Phagocytoseaktivität gegenüber Brucellen auch nach Infektionen mit Pasteurellen und Colikeimen beobachten,

verdienen in diesem Zusammenhang aber jedenfalls Beachtung.

Die Frage, ob immunitäts- und infektionsbedingte Phagocytose-Indices unterschieden werden können, läßt sich aus den Versuchsergebnissen ebenfalls beantworten. Sie muß im großen und ganzen verneint werden. Es entfällt somit auch die Möglichkeit, bei zweifelhaften Agglutinationstiter mit Hilfe dieser Methode zu entscheiden, ob ein Infektions- oder ein Impftiter vorliegt. In der Regel hat sich zwar bei den Rindern unmittelbar nach der Infektion eine höhere Phagocytoseaktivität eingestellt als vorher vorhanden war. Ausnahmen, in denen der Anstieg nicht sehr signifikant war, sind aber sowohl bei den mit Totimpfstoff bzw. Buck 19 geimpften Rindern (z. B. Tiere Nr. 11, 24) als auch bei den nicht geimpften Kontrollen (Tier Nr. 25) vorgekommen. Andererseits wiesen auch nicht infizierte und nicht schutzgeimpfte Tiere (Tabelle 6) manchmal einen nicht unerheblichen Index auf.

Aus dem Verhalten der Phagocytoseaktivität nach der Infektion kann auch nicht auf die Schutzwirkung eines Impfstoffes geschlossen werden. Obwohl in beiden Impfgruppen nach der künstlichen Infektion die Phagocytose-IndeXe übereinstimmend bis praktisch zu den Höchstwerten gestiegen sind, war der Impfschutz doch sehr unterschiedlich. Von den mit Totimpfstoff geimpften Rindern verkalbten praktisch alle Tiere, während von den mit Buck 19 vakzinierten und infizierten 6 Tieren keines verkalbte.

Zur Erklärung der Erscheinung, daß bei älteren Rindern der phagocytäre Index ohne eine Infektion oder Schutzimpfung steigt, ist auf die mögliche Rolle der Trächtigkeit und auf unspezifische Einflüsse infolge anderer bakterieller Infektionen bereits hingewiesen worden. Man könnte nun auch noch in Erwägung ziehen, ob nicht die für den Test verwendeten Bakterien eine erhöhte Phagocytose bewirkten. Nach Huddleson werden ja R-Formen der Brucellen auch im Blut gesunder Meerschweinchen phagocytiert, während dies bei S-Formen nicht der Fall ist. Bei Verwendung von Bakterienaufschwemmungen, die beide Dissoziationsformen der Brucellen enthalten, können also unter Umständen falsche Ergebnisse zustandekommen. Die von mir verwendeten Differenzierungsmethoden für R- und S-Formen, die Henry'sche Beleuchtung und die Trypaflavin-Agglutination sind aber sehr zuverlässig.

Außerdem habe ich meine Versuche beim Meerschweinchen und beim Rind parallel und stets mit den gleichen Bakterienaufschwemmungen ausgeführt. Hätten sich die von mir benützten Bakterien im Laufe der Zeit verändert, so könnte man annehmen, daß der phagocytäre Index auch beim Meerschweinchen und bei allen Rindern ohne Ausnahme gestiegen wäre. Das war jedoch weder

bei den Meerschweinchen noch bei den Rindern der Fall.

Auch mit den von Heilmeyer und Hiltmayer sowie von Gylstorff angegebenen phagocytosefördernden Momenten kann man das Phänomen nicht erklären. Licht und Bewegung, beides Faktoren, welche die Phagocytose begünstigen, hatten die Versuchstiere auf der Weide zu Beginn der Versuche. Gerade in dieser Zeit besaßen sie aber eine niedrigere Phagocytoseaktivität als später während der Stallhaltung.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Der Opsonocytophagentest wurde bei schutzgeimpften sowie infizierten Meerschweinchen und Rindern über einen längeren Zeitraum hinweg laufend durchgeführt. Dabei zeigte sich folgendes:

1. Gesunde Meerschweinchen wiesen immer einen negativen oder sehr niedrigen Phagocytose-Index auf.
2. Nach einer Infektion mit virulenten Brucellen (Stamm 544 Weybridge) sowie nach Schutzimpfung mit Lebendimpfstoff Buck 19 und mit Totimpfstoff nach Lembke stieg der Phagocytose-Index schon nach wenigen Tagen an.
Virulente Brucellen riefen eine deutlich höhere und länger anhaltende Phagocytoseaktivität hervor als die Impfstoffe.
3. Gesunde unter 2 Jahre alte Rinder besitzen in der Regel keine oder nur eine geringe gegen die S-Form von *Brucella abortus* gerichtete Phagocytoseaktivität. Bei älteren und insbesondere trächtigen Tieren wurde ein unspezifisches Ansteigen des Phagocytose-Indexes beobachtet.
4. Mehr als 12 Monate nach Schutzimpfungen mit Totimpfstoff nach Lembke und Lebendimpfstoff Buck 19 konnte bei Rindern noch eine gesteigerte Phagocytoseaktivität festgestellt werden. Der Phagocytose-Index zeigte bei den mit der Lebendvaccine vorbehandelten Tieren höhere Werte und ein konstanteres Verhalten als bei den mit dem Totimpfstoff behandelten Rindern.
5. Nach der künstlichen Infektion der im 5. Monat tragenden Rinder mit dem Stamm 544 (Weybridge) erreichte bei schutzgeimpften und nicht immunisierten Rindern der Phagocytose-Index seine höchsten Werte. Zwischen dem Grad der eingetretenen Schutzwirkung und dem Verlauf der Phagocytosekurven bestanden, wie ein Vergleich der Verkalbezahlen erkennen ließ, keine gesetzmäßigen Beziehungen.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- Boerner und Mudd: Am. J. Med. Sc. 23, 189 (1935).
- Cotton C. M.: An intensiv study of postvaccination responses in groupes of calves vaccinated intracutaneous-ly and subcutaneously with Strain 19 Brucella abortus Vaccine.
Am. J. Vet. Res. 14, 337, (1953).
- Diernhofer V.: Das Problem gegen die Immunisierung der Brucellose.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 42, 659, (1938).
- Gates F. L.: A method of standardizing bacterial Suspensions.
J. exper. Med. 31, 105, (1920).
- Gylstorff L.: Die Bedeutung der Phagozytose für Infektions-krankheiten.
Mh. Vet. Med. 10, 290, (1958).
- Hallmann L.: Bakteriologie und Serologie, 2. Aufl.
Stuttgart, 1955 S. 682.
- Heilmeyer L., und A. Hittmaier:
Handbuch der gesamten Hämatologie,
Bd. 1, Teil 1.
München-Berlin-Wien 1957.
- Hoeden J. van der: De toepassing von het verschijnsel der phago-
cytose bij de diagnostick der Brucellosen, I. -II.
Tijdschr. Diergenesk 67, 910 u. 963, (1940).
- Huddleson J. F., H. W. Johnson, E. E. Hamann:
A study of the Opsono-Cytophagic power of
the blood and allergic skin reaction in Brucella-
infection and immunity in man.
(Am. J. Public Health 23, 917, (1933).

- Huddleson J. F., H. W. Johnson, D. B. Meyer:
A method for measuring the Opsonocytophagic power of the blood of cattle for Brucella.
Michigan technical Bull. Nr. 149 (1936) .
- Hutyra, Marek, Manninger, Mócsy:
Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, Bd. I.,
Jena 1954, S. 813 - 847.
- Leishman W. B.:
Studies on phagocytosis.
Trans. Pathological Soc. London 56, 344, (1905) .
- Meyer K. F., B. Stewart, L. Veazie, B. Eddie:
Brucella Phagocytic Index-Test.
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 32, 284, (1934) .
- Meyn A. und E. Schrinner:
Zur Frage der Schutzimpfung gegen Rinderbrucellose mit Adsorbatimpfstoffen.
Mh. Tierhk. 11, 147, (1959) .
- Munger M., Myrtle, J.F. Huddleson:
The Dedection of antigenic variants of Brucella by means of an opsonocytophagic Test.
C. Bost. (Amer.) 35, 255, (1938) .
- Opitz, K.:
Untersuchungen über die phagocytäre Fähigkeit der Rinderleukocyten gegenüber der Brucella-Bang.
Vet. -med. Diss. Wien 1938.
- Parnas J., J. Mierzejevska:
Investigations on specifity of Opsonocytophagic test in the course of chronic Brucellosis.
Zschr. Imm. -Forschg. 115, 306, (1958) .
- Rolle M.:
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Stuttgart, 1958 S. 98 - 99.

- Schindler R., G. Godglück, H. Fiege:
Abortus Bang.
Wissensch. Beiträge f. die tierärztl. Praxis,
Marburg (Lahn) , 1954.
- Schließer Th. :
Bericht über eine Dienstreise zum Agricultural
Research Council, Field Station, Compton/Berks
(England) .
Tierhygienisches Institut der Universität
München, (1958) .
- Smetaczek A. :
Untersuchungen über die phagocytäre Fähig-
keit der Leukocyten des Meerschweinchens
gegenüber der Brucella Bang.
Vet. -med. Diss. Wien 1938.
- Veazie L., K. F. Meyer:
Heparin as an anticoagulant in the Brucella
phagocytic index test.
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 32, 1616,
(1935) .
- Veitch R. :
A simple and rapid method of estimating the
phagocytic power of different bloods.
J. Path. and Bact. 12, 353, (1908) .
- Wirth D. :
Grundlagen einer klinischen Hämatologie der
Haustiere.
München-Berlin-Wien 1950.
- Wright A. E., D. Netley, R. Steward:
Role of the blood fluids in phagocytosis.
Proc. Royal Soc. London, 72, 357, (1904) .

Am Schluß meiner Dissertation ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. A. Meyn für die Überlassung des Themas und seine jederzeit bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Herrn Dr. Th. Schließer sage ich herzlichen Dank für mannigfache Anregungen und die Durchsicht des Manuskriptes sowie Herrn Dr. E. Schrin-
ner für seine wertvollen Hinweise und praktischen Ratschläge.

LEBENS LAUF

Am 2. März 1927 wurde ich in Fertőendréd (Ungarn) geboren, wo ich von 1933 - 1939 die dortige Volksschule besuchte. Von 1939 - 1947 war ich an der Oberschule, dem Benediktiner-Gymnasium in Győr, an dem ich im Juni 1947 das Abitur bestand. In den folgenden zwei Jahren von 1947 - 1949 studierte ich 4 Semester an der Veterinär-wissenschaftlichen Fakultät der Agrar-wissenschaftlichen Universität in Budapest. Im Jahre 1949 habe ich Ungarn verlassen.

Die Jahre 1949 - 1951 verbrachte ich in München, wo ich zwei weitere Fachsemester an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität ablegte. Während dieser Zeit verdiente ich meinen Lebensunterhalt als Werkstudent. 1951 unterbrach ich mein Studium und leistete bis 1956 eine 5jährige Dienstzeit bei der Armee der Vereinigten Staaten ab.

Im Mai 1957 kehrte ich nach München zurück um mein Studium wieder fortzusetzen, das ich im Jahre 1959 mit dem Staatsexamen abgeschlossen habe.

